

**Untersuchungen über die photochemische
Wirkung von cancerogenen
Kohlenwasserstoffen auf die
Desoxyribonukleinsäure
und auf die Ribonukleinsäure**

Peter Koyi Idundun

1965

Aus der Medizinischen Fakultät Frankfurt am Main
Institut für therapeutische Biochemie

Direktor: Prof. Dr. Adolf Wacker

Untersuchungen über die photochemische Wirkung von cancerogenen
Kohlenwasserstoffen auf die Desoxyribonukleinsäure
und auf die Ribonukleinsäure

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johann-Wolfgang-Goethe Universität
zu Frankfurt am Main

Vorgelegt von
Peter Koyi Idundun
aus Koko-Nigeria
Frankfurt am Main 1965

Dekan : Prof. Dr. med. H. Frick

Referent : Prof. Dr. rer. nat. A. Wacker

Korreferent : Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung : 12. Juli 1965



INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
II. THEORETISCHE BETRACHTUNG	3
A. Die Nukleinsäuren	3
1. Ihre Struktur	3
2. Ihre UV-Absorptionsspektren	5
3. Ihre chemische Reaktivität mit cancerogenen Kohlenwasserstoffen	6
B. Die cancerogenen Kohlenwasserstoffe	9
1. Das 1,2,5,6-Dibenzanthracen	10
2. Das 3,4-Benzpyren	11
3. Das 3- oder 20-Methylcholanthren	11
4. Die chemische Reaktivität	12
C. Die Bestrahlung	14
III. MATERIAL UND METHODEN	16
A. Die Salmon-Spermien-DNS und RNS-Core-Lösungen	16
1. Die Salmon-Spermien-DNS-Lösung	16
2. Die RNS-Core-Lösung	17
B. Die Gefriertrocknung	17
C. Die Hydrolyse	17
1. Die Salmon-Spermien-DNS-Hydrolyse	19
2. Die RNS-Core-Hydrolyse	19
D. Die Papierchromatographische Auftrennung der Basen	20
1. Salmon-Spermien-DNS-Auftrennung	21
2. RNS-Core-Auftrennung	23

	<u>Seite</u>
E. Die Elution und die Spektrometrie	23
1. Die Salmon-Spermien-DNS	25
2. Die RNS-Core	25
F. Die Kohlenwasserstoffe	26
1. Die Salmon-Spermien-DNS	26
2. Die RNS-Core	26
G. Die Bestrahlung und die Erwärmung	27
H. Addendum	28
IV. ERGEBNISSE	30
1. Die Gruppe A	30
2. Die Gruppe B	31
V. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	37
VI. ZUSAMMENFASSUNG	40
VII. LITERATURVERZEICHNIS	41

I. EINLEITUNG

Einleitung und Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Wirkung von cancerogenen Kohlenwasserstoffen und Bestrahlung auf die Desoxyribonukleinsäure (DNS) und auf die Ribonukleinsäure (RNS) zu untersuchen.

Die Bedeutung der äußeren Einflüsse auf die Entstehung von Geschwülsten wurde bereits von VIRCHOW erkannt. Er wies darauf hin, daß Tumoren dort auftreten, wo chronische Reize auf Zellen und Gewebe einwirken.

PERICVAL POTT berichtete in seiner Veröffentlichung unter dem Titel "Surgical Observations" (1775) über das vermehrte Auftreten von Hodenkrebs bei Schornsteinfegern. Dadurch wurde das Vorhandensein von cancerogenen Faktoren im Ruß angedeutet.

140 Jahre später gelang es den japanischen Forschern, YAMAGIVA und ISCHIKAWA, durch wiederholte Anwendung von Teer bei Versuchstieren Hauttumoren zu induzieren.

In den Jahren 1937 und 1938 war KENNAWAY in der Lage, karzinogenen Teer aus organischem Material wie Haar und menschlichem Gewebe zu isolieren. Später begründete er die Forschung der karzinogenen Bestandteile in der Pechkohle. Durch das synthetisch dargestellte 1,2,5,6-Dibenzanthracen, das sich als erster polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff karzinogener Natur erwies, konnte er an Mäusen Tumoren hervorrufen. Aus seiner wissenschaftlichen Arbeit entwickelte

sich in überzeugender Weise eine Beziehung zwischen chemischer Konstitution und biologischer Funktion.

Dennoch war PAUL EHRLICH der eigentliche Begründer dieser Forschungsrichtung. Schon zur Zeit der Jahrhundertwende erkannte er im Äthylenimin ein chemisches Agens, das fähig war, irreversible chemische Veränderungen in damals bezeichneten Protoplasten zu induzieren.

Das Vorkommen hoher Konzentrationen von Desoxypentosen und Pentosen in Polynukleotiden von Zytoplasten und Nukleoplasten schnell proliferierenden Tumorengewebes, führte zu der Annahme, daß die biologische Aktivität in den Zellen mit der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und mit der Ribonukleinsäure (RNS) verknüpft sein könnte. Der Beweis, daß zellfreie Extrakte von leukämischen Zellen Tumoren produzieren können, wenn sie in neugeborene Mäuse injiziert werden, zeigte die Möglichkeit an, daß Nukleinsäuren die Träger von neoplastischen Transformationen sein könnten.

Als erste demonstrierten CHARLES HEIDELBERGER und DAVENPORT die Bindung eines C^{14} -haltigen Kohlenwasserstoffes 1,2,5,6-Dibenzanthracen (DBA) an die DNS und die RNS von Mäuse-Epidermis-Zellen. Eine direkte Wechselwirkung zwischen cancerogenen Kohlenwasserstoffen und Nukleinsäuren wurde dadurch bewiesen.

Cancerogene Kohlenwasserstoffe sind keinesfalls die einzigen Faktoren bei der Karzinogenese. Eine bekannte Tatsache ist die Tumoreninduktion durch DNS-Viren (z.B. Polyoma-Virus). Die Tumorenbildung bei Röntgenologen warf die Frage nach einem physikalischen Agens im Zusammenhang mit der Karzinogenese auf. Heute ist bekannt, daß ionisierende, ultraviolette (UV) und infrarote (IR) Strahlung imstande sind, eine Veränderung in der Nukleinsäurestruktur zu bewirken, die eine Störung der normalen

genetischen und epigenetischen Kontrolle nach sich zieht. Karzinogenese durch ionisierende Strahlung hat viel Aufmerksamkeit erhalten.

II. THEORETISCHE BETRACHTUNGEN

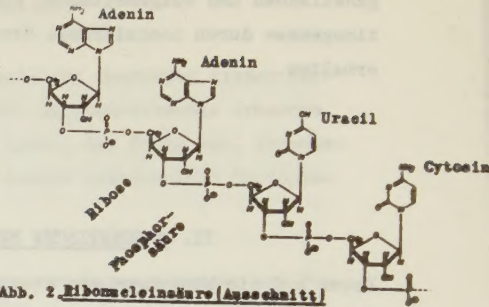
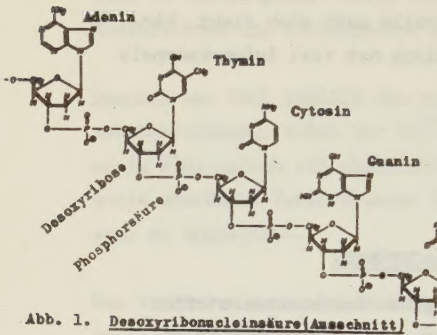
Bevor auf die Wirkungen von karzinogenen Kohlenwasserstoffen eingegangen werden kann, müssen einige theoretische Betrachtungen über die abhängigen Faktoren bei der Karzinogenese vor-
ausgeschickt werden.

A. Die Nukleinsäuren

1. Ihre Struktur

Die DNS ist ein doppel-strängiges helixförmiges Polynukleotid, das vier Arten von Nukleotiden enthält: Adenyl-, Guanyl-, Cytidyl- und Thymidylsäure, die durch 3' - 5' Phospho-Diester-Bindung der Desoxyribose "moeties" verbunden sind. Eine Ausnahme dieser Doppelhelix-Struktur bildet die natürliche Einstrang-DNS in ϕ - X - 174 Phagen und die ringförmige molekulare DNS in Polyoma-Viren.

Die RNS enthält ebenfalls vier verschiedene Nukleotide. Es wird jedoch die Thymidylsäure der DNS in der RNS durch Uridylsäure ersetzt. Die Phospho-Diester-Bindung ist ribosidisch.



Die kovalente Primärstruktur der Nukleinsäuren der DNS und der RNS kann deshalb als Mononukleotid-Polymeres aufgefaßt werden. Die drei Bauelemente eines Mononukleotiden vereinigen sich nach KOSSEL in der Reihenfolge:

Base - Pentose - Phosphorsäure.

Die mit einer Pentose zum Nukleosid vereinigten Basen leiten sich von zwei Ringsystemen ab, den Pyrimidinen und den Purinen. Die Verknüpfung erfolgt glykosidisch über eine C-N-Bindung, und zwar sind die Purinbasen in 9-Stellung, die Pyrimidinbasen in 3-Stellung β -glykosidisch mit der Pentose verknüpft, wie in Abb. 1 und 2 gezeigt wird.

Nach WATSON und CRICK besteht die Sekundärstruktur der DNS aus zwei rechtsdrehenden helixförmigen Polynukleotid-Ketten, wobei beide Ketten dieselbe Achse haben. Nach 10 Nukleotiden haben die beiden Ketten in der Helix eine vollständige Windung in einem Abstand von $34 \text{ \AA}$ und mit einem Durchmesser von $20 \text{ \AA}$

durchlaufen. Die Sequenz der Internukleotidbindungen in beiden Ketten läuft in entgegengesetzter Richtung d.h. $3' \rightarrow 5'$ und $5' \rightarrow 3'$. Jede Purin- oder Pyrimidinbase liegt normal zu der Helixachse und ist mit einer spezifischen komplementären Base in der gegenüberliegenden Kette durch Wasserstoffbrücken nämlich Adenin-Thymin und Guanin-Cytosin verbunden. Die Basen liegen an der Innenseite des Doppelhelix, die Phosphatgruppen an der Außenseite. Diese spezifische räumliche Anordnung - Purin zu Pyrimidin - wird in allen Fällen entlang der Helixachse als vollkommen stereochemische Regelmäßigkeit erhalten.

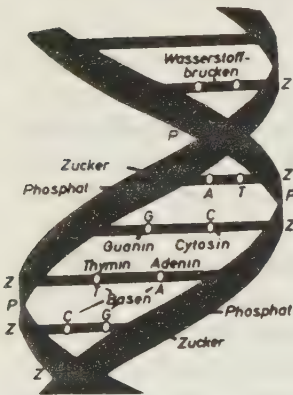


Abb. 3 Schematische Darstellung des WATSON-CRICK-Modells der DNS

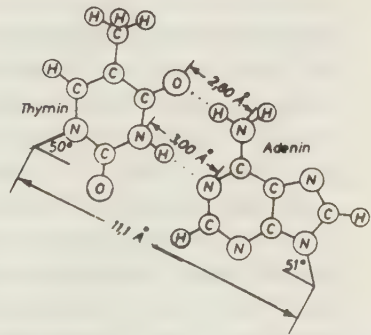


Abb. 4 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Thymin und Adenin in der DNS-Helix

2. Ihre UV-Absorptionsspektren

Die Purin- und Pyrimidinbasen der DNS heißen Guanin, Adenin, Cytosin, und Thymin. Diese Basen sind verantwortlich für die

UV-Absorption der Nukleinsäuren. Die UV-Absorption der Basen geht im wesentlichen auf den gleichen Elektronenübergang wie beim Benzol zurück, d.h. die bei etwa 260 nm zu findende Absorptionsbande kommt hauptsächlich durch einen $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang zustande; die Absorptionsbande der Purinbasen besteht aus zwei von einander unabhängigen Anregungen dieser Art. Neben dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang beruht die UV-Absorption der Basen zu einem geringen Anteil (etwa 10 %) auch auf einem $n \rightarrow \pi^*$ Übergang, der auf die Anregung der freien Elektronen an den Ringstickstoffatomen zurückzuführen ist, der eine weit geringere Absorption verursacht. Die Absorptionsbande liegen ein wenig mehr im langwelligen Bereich als die des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs und werden von dieser weitgehend überdeckt.

Eine quantitative Analyse der DNS oder der RNS setzt somit die spektrophotometrische Bestimmung ihrer Basenkomponenten voraus. Die Lage und die Intensität der UV-Bande der Basen werden durch den pH-Wert ihrer Lösungsmittel beeinflusst. Eine zuverlässige quantitative Bestimmung aller dieser Stoffe aus den spektroskopischen Daten ist daher nur im Bereich solcher pH-Werte möglich, wenn sie einen hinreichenden numerischen Abstand von den pK_A -Werten der betreffenden Basen haben. Jeder Faktor, der den pH-Wert des Lösungsmittels an den pK_A -Wert der Basen nähert, ruft die Ionisierung ihrer NH_2 -Gruppe sowie ihrer $-NH-CO$ -Gruppe hervor. Diese Ionisierung wirkt sich demnach in einer bathrochromen Verschiebung und in einer erheblichen Extinktionssteigerung aus.

3. Ihre chemische Reaktivität mit cancerogenen Kohlenwasserstoffen

Die Reaktionsfähigkeit cancerogener Kohlenwasserstoffe mit der DNS setzt ihre "Solubilization" darin voraus. Beweise für die Verbindung der DNS mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen sind durch spektroskopische Untersuchungen ihrer Basen erhalten

worden. Es wurde gezeigt, daß das Adenin und das Guanin der Nukleinsäuren die Fähigkeit besitzen, Komplexe mit 3,4-Benzpyren zu bilden (WEIL-MALHERBE). BOYLAND und GREEN (1962) zeigten, daß das Verhältnis Purin : Kohlenwasserstoff mit zunehmender Purin-Konzentration abnimmt. In 0,07 M Coffein lösen 1.000 Moleküle Coffein ein Molekül Benzpyren. In einer 0,001 molaren Coffeinelösung sind 11.000 Moleküle erforderlich, um ein Molekül Benzpyren zu lösen. Wenn Benzpyren mit Purin in Verbindung steht, erfolgen Reduktion und bathochrome Verschiebung der UV-Absorption. Diese Veränderungen sind den Komplexverbindungen analog, die zwischen Kohlenwasserstoffen und aromatischen Stickstoffverbindungen gefunden wurden. Sie sind durch die oben erwähnte Polarisationskraft oder Ionisierung erklärlich.

Beweise für die Löslichkeit der cancerogenen Kohlenwasserstoffe in der DNS wurden von LIQUORI und Mitarbeiter erbracht. Bei geringen DNS-Konzentrationen stellten sie eine Zunahme der relativen Löslichkeit fest, die auf eine Verdünnungsdenaturierung zurückgeht. Sie fanden weiter, daß die Benzpyrenmenge, die in der DNS gelöst wurde, bei der Hitzedenaturierung dreifach erhöht war. Es muß jedoch an dieser Stelle erwähnt werden, daß solche Hitzedenaturierungen die vollständige Zerstörung der DNS-Doppel-Helices in "Single-Strands" nicht hätte herbeiführen können, denn in einer DNS-Lösung, in der "Single Strands" vorkommen, ist die "Solubilization" der cancerogenen Kohlenwasserstoffe unbedeutend. Ein weiterer Beweis für die Bindung der DNS mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen wurde durch die Untersuchung des Effektes der Kohlenwasserstoffe auf die thermische Denaturierung Temperatur (T_m) von DNS erhalten. Dies resultiert aus den Messungen über die Erhöhung der optischen Dichte der DNS. Bei 260 nm, 1,2,5,6-Dibenzanthracen, 3-Methylcholanthren, Anthracen und 3,4-Benzpyren erhöhten alle die T_m -Werte. Demgemäß scheint die Gegenwart von Komplexkohlenwasserstoffen die DNS zu stabilisieren und die thermische Denaturierung zu reduzieren.

Obwohl Beweise für eine chemische Bindung oder für eine Reaktion zwischen carcinogenen Kohlenwasserstoffen mit der DNS vorzuliegen scheinen, sind die Ansichten der Biochemiker über den Mechanismus dieser Reaktion uneinheitlich. BOYLAND und GREEN haben die "Intercalation Hypothese" postuliert, um diesen Mechanismus zu erklären. Die EinschluShypothese von BOYLAND und GREEN beruht eigentlich auf dem von LERMANN (1961) erbrachten Beweis, daß einige Acridin-Farbstoffe zwischen Wasserstoff-Bindungen in die DNS-Doppelhelix eingeschlossen sind. HEIDELBERGER et al. (1964), die dieser Hypothese nicht zustimmen, behaupten, daß die "Solubilization" cancerogener Kohlenwasserstoffe (Benzpyren) in DNS-Lösungen nicht auf "Intercalation" zurückzuführen wäre, sondern auf die allgemeine und nicht spezifische Adsorption an die DNS.

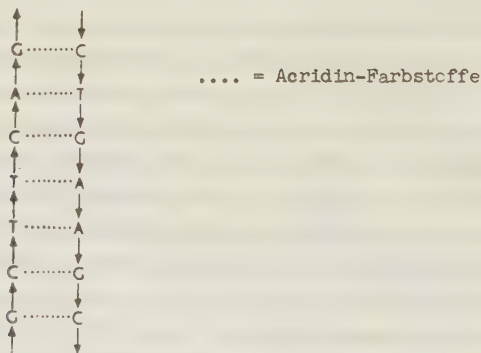


Abb. 5 Schematische Darstellung der "Intercalation" von Acridin-Farbstoffen zwischen Basen-Paaren der DNS (MICHELSON)

Die "Intercalation" von Acridin-Farbstoffen zwischen Basen-Paaren der DNS ist leicht vorstellbar, weil die phosphoryldissoziierenden Gruppen der Polynukleotid-Ketten Salzbildungen mit extrazyklischen

Amino-Gruppen der Acridin-Farbstoffe eingehen können; wobei die Deformationsenergie zur "Intercalation" gewonnen wird. Jedoch begünstigt die Trägheit und die molekulare Größe von cancerogenen Kohlenwasserstoffen keineswegs die Bildung solcher Deformationsenergien. Dennoch behaupten BOYLAND und GREEN, daß die Komplexe von DNS und von polyzyklischen Verbindungen die gleiche Struktur haben könnten, in welcher die planaren Kohlenwasserstoffe sich zwischen den Purin-Pyrimidin-Paaren der DNS einschließen. Nach ihrer Auffassung haben viele der cancerogenen Kohlenwasserstoffe ungefähr dieselben Größen und Formen wie Purin-Pyrimidin-Paare. Beide Wissenschaftler zeigten, daß Molekülmodelle von cancerogenen Kohlenwasserstoffen sich in die drei dimensional Modelle des DNS-Moleküles hineinfügen würden, wie es WATSON und CRICK vorgeschlagen hatten. Polyzyklische Moleküle, die in dieser Weise eingefügt werden, würden die Nukleinsäure strecken und verdrehen. Solche Störungen mögen die cancerogene Wirkung dieser Verbindungen erklären. Es wurde gefunden, daß es nicht möglich ist, mehr als ein Molekül Benzpyren in 90 Basen-Paaren der DNS einzuführen.

B. Die cancerogenen Kohlenwasserstoffe

Unter mehr als 450 Verbindungen, die bis zum Jahre 1953 als carzino-gen erkannt wurden, waren über 200 aromatische Kohlenwasserstoffe, deren Derivate, sowie ihrer Analoga (SCHÖNTHAL). Die vier carcinogen wirksamsten und für biologische Untersuchungen am meisten verwendeten Kohlenwasserstoffe sind: 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen, 3,4-Benzpyren, 1,2,5,6-Dibenzanthracen und 3- oder 20-Methylcholanthren.

Die drei letzten Kohlenwasserstoffe werden im nachfolgenden Kapitel behandelt.

Das Vorkommen der drei cancerogenen Kohlenwasserstoffe im Kohlen-teer ist nachgewiesen worden. 3,4-Benzpyren ist relativ leicht durch sein charakteristisches äußerst intensives Fluoreszenzspektrum zu identifizieren, selbst in Gegenwart anderer Substanzen; diese Fluoreszenz ist 15 - 20 x intensiver als die des 20-Methylcholanthrens und sogar ungefähr 200 x stärker als die des 1,2,5,6-Dibenzanthracens. Eine 3,4-Benzpyren-Lösung zeigt eine blaue Fluoreszenz, während die feste Form gelb fluoresziert. Obgleich bis jetzt 20-Methylcholanthren wegen seiner hohen carcinogenen Aktivität und seiner guten Löslichkeit als karzinogene Substanz zur biologischen Untersuchung bevorzugt wurde, scheint trotzdem das 3,4-Benzpyren das Lieblingskarzinogen zur Untersuchung der chemischen Reaktionsfähigkeit von solchen Kohlenwasserstoffen mit der DNS zu sein.

1. Das 1,2,5,6-Dibenzanthracen

Es war der erste Kohlenwasserstoff, an dem cancerogene Wirksamkeit mit Sicherheit beobachtet wurde. Jedoch muß die karzinogene Aktivität im Vergleich mit der von 20-Methylcholanthren und der von 3,4-Benzpyren als nur mäßig beschrieben werden.

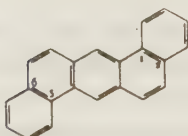


Abb 6 : 1,2,5,6-Dibenzanthracen,
(farblos, Schmp. 266°)

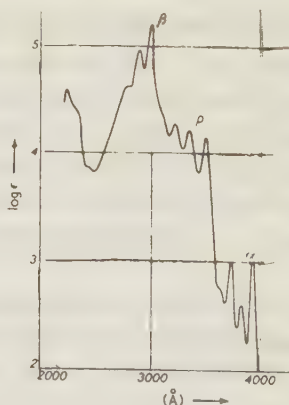


Abb. 7 Absorptionsspektrum des
1,2,5,6-Dibenzanthracens in
Dioxan: α , 3940 (3,01), P,
3500 (4,16), A, 2990 (5,20)
(CLAR)

2. Das 3,4-Benzpyren

Das 3,4-Benzpyren kommt nicht nur in Kohlenteer vor, sondern auch im Ruß, im Schieferöl, im Tabakteer und in verunreinigter Großstadtluft. Die erste Isolierung des Benzpyrens wurde von HIEGER aus 2 Tonnen Kohlenteer durchgeführt. Der kondensierte Teer aus dem Rauch von 100 Zigaretten enthält z.B. 2,2 μ 3,4-Benzpyren. Die nachfolgende Abbildung zeigt das Absorptionsspektrum des kristallisierten Benzpyrens in Cyclohexan.

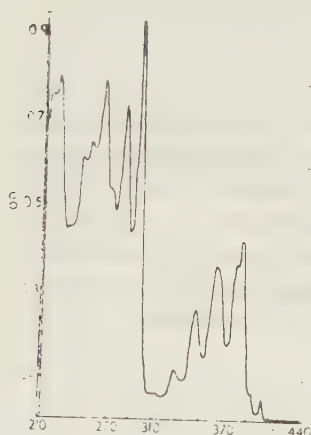
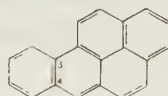


Abb. 9

UV-Absorptionsspektrum des kristallisierten Benzpyrens in Cyclohexan



3,4-Benzpyren,
(hellgelb, Schmp. 179°)

Abb. 8

3. Das 3- oder 20-Methylcholanthren

Es gehört der Cholanthrengruppe von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen an. 20-Methylcholanthren wurde zuerst von WIELAND und DANE durch den stufenweisen Abbau der Desoxycholsäure dargestellt.

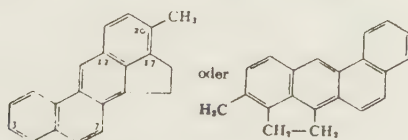


Abb. 10

Methylcholanthren
(hellgelb, Schmp. 180°)

Später gewann man es aus Galle durch Abbau von Cholsäure, Methylcholanthren erhält man durch den pyrolytischen Abbau eines Cholesterinderivates einer Substanz, die in allen Geweben des menschlichen Körpers vorkommt. Die Gallensäure und das Cholesterin gehören zu den Steroiden. Wegen der Darstellung von Methylcholanthren aus Galle und Cholesterin hat COOK vorgeschlagen, daß abnorme metabolische Aromatisierung der Steroide zu intrazellulärer Bildung von Methylcholanthren oder ähnlichen aromatischen Karzinogenen führen könnte; dies würde das spontane Auftreten von Tumoren erklären. Jedoch ist es bis jetzt unmöglich gewesen, den experimentellen Beweis für die intrazelluläre Bildung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen zu erbringen.

4. Die chemische Reaktivität

Im allgemeinen hängt die Aktivität einer cancerogenen Substanz von ihrer "Solubilization" im Purin ab (HADDOW). Unter den aromatischen Kohlenwasserstoffen ist ein gewisser Grad molekularer Komplexbildung und chemische Reaktionsfähigkeit für die karzinogene Wirkung erforderlich. Eine "Phenanthrenoid"-9,10-Bindung wurde für carcinogene Aktivität notwendig gehalten. Diese Behauptung wird durch das folgende Beispiel unterstützt:

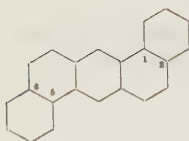


Abb. 11

1,2,5,6-Dibenzanthracen

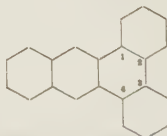


Abb. 12

1,2,3,4-Dibenzanthracen

Das 1,2,5,6-Dibenzanthracen ist eine starke Karzinogensubstanz, aber das 1,2,3,4-Dibenzanthracen ist unwirksam. Die im Jahre 1928 von OTTO SCHMIDT begonnenen Versuche, die carzinogene Wirksamkeit und die elektronische Konfiguration der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe in Übereinstimmung zu bringen, wurden von dem französischen Chemiker PULLMANN fortgesetzt. Nach der PULLMANN-DAUDEL-THEORIE bildet die 9,10-"Phenanthrenoid"-Bindung die "K"-Region. Diese Region auch "Krebs"-Region genannt, ist die Stelle, an der carzinogene Kohlenwasserstoffmoleküle die größte Elektronendichte besitzen. Andere Positionen, im Hinblick auf die chemische Reaktivität von günstigen Elektronendichten sind die "L"-Regionen (meso-anthrenoid Bindung) und die "M"-Region (metabolische Bindung). Die Aktivierungsenergie der "K"-Region darf $3,31\beta$ nicht überschreiten, die der "L"-Region muß allerdings den Wert von $5,66\beta$ überschreiten. Nach BOYLAND heißt die "K"-Region das "Carcinogenophor" des Kohlenwasserstoffes.

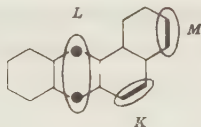


Abb. 13 Schematische Darstellung der "K"-, "L"- und "M"-Region eines aromatischen Kohlenwasserstoffmoleküles

Die Tatsache, daß die metabolische Oxydation an der "M"-Region des Moleküles von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen stattfindet, mag die Inaktivität der Metaboliten von cancerogenen Kohlenwasserstoffen erklären; denn die Elektronendichte an der "M"-Region ist relativ niedrig.

Die Beziehung zwischen der carcinogenen Aktivität der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe und ihrer elektronischen Konfiguration zeigt, daß 1,2,5,6-Dibenzanthracen, 3-Methylcholanthren und 3,4-Benzpyren - wenn überhaupt - mit der DNS oder der RNS reagieren, muß die Reaktionsstelle die "K"-Region ihrer respektiven Molekeln sein, denn die "K"-Region, die die geringste Aktivierungsenergie besitzt, ist weniger als 3,31 β . Diese Energie kann durch Bestrahlung erreicht werden.

C. Die Bestrahlung

Die Relation von Bestrahlung und Karzinogenese beruht auf der Beobachtung, daß bei den ersten Röntgenologen, die nur wenige Schutzmaßnahmen kannten, häufig Hauptgeschwülste auftraten. Die Effekte von Tageslicht, Röntgen-, Radium, UV- und IR-Strahlen auf Nukleinsäuren haben viel Aufmerksamkeit erhalten. Die Wirkungen der UV-Strahlen sind am umfassendsten untersucht worden. Im allgemeinen führt die Bestrahlung der DNS zu Veränderungen in ihrer molekularen Struktur und die wichtigsten Kriterien für diese Veränderungen sind Verminderung der Viskosität, der Hyperchromizität sowie Abweichungen der Titrationskurven.

WACKER, DELLWEG und WEINBLUM haben nachgewiesen, daß nach der UV-Einwirkung auf die DNS eine Dimerisierung der Thyminbasen erfolgt, allerdings lediglich bei solchen, die in Polynukleotidstrang unmittelbar miteinander benachbart sind. Diese Dimerisierung ist eine Gleichgewichtsreaktion, die bis 280 nm auf der Seite des Dimeren, bei 240 nm dagegen weitgehend auf der Seite des Monomeren liegt. Die UV-Bestrahlung der RNS sollte auch zur Dimerisierung von Uracil führen. In der Tat ließ sich in Modellversuchen bei Uracil ebenfalls eine Dimerenbildung nachweisen. Die Bestrahlung von Uracil lieferte zwei Photoprodukte, A und B (Lösungsmittelsystem = Butanol-Wasser). A ist

das Uracildimere mit $R_f = 0,04$. B ist ein Uracil-Wasseranlagerungsprodukt mit $R_f = 0,18$ (WEINBLUM).

Ein anderer experimenteller Beweis für die Wirkung der Bestrahlung auf die DNS wird von DAVISON erbracht. Er wies darauf hin, daß wenn eine Lösung von Acridin-Orange in DNS bestrahlt wird, "Single-Strands"-Brüche in der DNS hervorgerufen werden, aber wenn die Lösung nicht bestrahlt wird, werden "Single Strands" nicht gebildet.

In dem nachfolgend erwähnten Versuch war die verwendete Bestrahlungsart das Tageslicht aus Quecksilberdampflampen (vgl. III G) das 4 % UV-Strahlen enthielt. HOWELL-CLARK hat experimentell nachgewiesen, daß die karzinogenen Kohlenwasserstoffe, 3,4-Benzpyren und 20-Methylcholanthren als Sensibilisatoren für Tageslicht wirken.

III. MATERIAL UND METHODEN

A. Die Salmon-Spermien-DNS und RNS-Core-Lösungen

Es wurde ein technisch reines Präparat von DNS aus Salmon-Spermien verwendet. Obwohl reine RNS in Wasser fast unlöslich ist, war das verwendete Präparat "RNS-Core 621" (Worthington Biochemical Corporation) in Wasser löslich, ohne die Lösung mit Natrium-Phosphat und Ammonium-Carbonat zu puffern. Darin liegt ein gewisser methodischer Vorteil. HOPKINS und SINSHEIMER haben durch Streulichtmessungen nachgewiesen, daß sich die Pentosenuklease-Ionen bei Zusatz von Elektrolyten in die RNS-Lösung von 1.600 Å auf 1.050 Å kontrahieren. Auch wurde mittels der Kernresonanz gezeigt, daß die beträchtliche Hydratation von Nukleinsäure in wässriger Lösung - wie an der Verschärfung der Absorptionslinien zu erkennen ist - mit zunehmender Elektrolyt-Konzentration weitgehend zurückgedrängt wird (JACOBSON).

1. Die Salmon-Spermien-DNS-Lösung

Eine 0,2 %ige Salmon-Spermien-DNS-Lösung wurde dadurch eingestellt, daß 46 mg DNS in 23 ml bi-distilliertem Wasser gelöst wurden. Die Lösung wurde in einem verschlossenen Glaskolben in einem Kühlschrank aufbewahrt, um eine Degradation oder eine Denaturierung der DNS zu vermeiden. Eine Denaturierung würde hyperchrome Veränderungen an der DNS hervorrufen, die die spektroskopischen Messungen beeinträchtigen könnten. Je 1 ml der eingestellten DNS-Lösung wurde in vier Ampullen einpipettiert:

1. Ampulle	---	Kontrolle
2. "	---	1,2,5,6-Dibenzanthracen
3. "	---	3-Methylcholanthren
4. "	---	3,4-Benzpyren

2. Die RNS-Core-Lösung

0,2 %ige Lösungen der RNS-Core wurden, wie bereits beschrieben, eingestellt und in gleicher Weise behandelt.

B. Die Gefriertrocknung

Zwecks Hydrolyse war es erforderlich, jede der 1 ml DNS-Lösungen in feste Form zu bringen. Diese wurde mittels "Centrifugal Freeze Dryer" (Speedivac) zustande gebracht. Die vier Ampullen wurden in der Vakuum-Maschine für ungefähr 14 Stunden stehen gelassen, dabei verdampften die Lösungen.

Es war schwer die 1 ml RNS-Lösung zu trocknen, weil RNS-Core in festem Zustand sich aus der Ampulle in der Vakuum-Maschine zerstreut. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde der Ampullenhals mit Glaswolle verstopft.

C. Die Hydrolyse

Der Abbau von Nukleinsäuren hat die möglichst quantitative Freisetzung von Purin- und Pyrimidin-Basen, Nukleosiden oder Nukleotiden zum Ziel; dabei sollten an den Nukleinsäurebasen keine Veränderungen, wie z.B. Desaminierung, auftreten. Wegen der Einfachheit wird am häufigsten eine Säurehydrolyse zur Freisetzung der Basen verwendet. Bezeichnend für die beiden Arten von Nukleinsäuren - DNS und RNS - ist, daß die Purinribosid- und die Purin-desoxyribosidbindung in der Regel zur Säurehydrolyse neigen, während die Pyrimidinribosid- und die Pyrimidindesoxyribosidbindung verhältnismäßig widerstandsfähig ist.

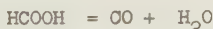
Die freien Purinbasen, Adenin und Guanin, bilden sich leicht durch Säurehydrolyse der beiden Nukleinsäure-Arten, während die Pyrimidinbasen bei der RNS als Mononukleotide oder bei der DNS als Nukleosid-Diphosphat zurückbleiben.

Man kann die DNS und die RNS auf folgende Arten hydrolysieren (CHARGAFF & DAVIDSON):

- i) mit 25 % H_2SO_4 zwei Stunden lang bei 175 °C.
Als Nachteil zeigt sich bei der DNS die Desaminierung von Cytosin in Uracil.
- ii) mit 0,4 - 6 N HCl zwei Stunden lang bei 120 °C.
Mit steigender Säurekonzentration nimmt allerdings die Freisetzung von Pyrimidinbasen und die Zerstörung der Purinbasen zu.
- iii) mit 12 N Perchlorsäure (etwa 70 %ig) eine Stunde lang bei 85 bis 100 °C. Perchlorsäure ist für den Abbau der DNS und der RNS in gleicher Weise geeignet. Dieses Verfahren führt zu keinen Veränderungen an den Basen; allerdings werden geringe Mengen von dem Kaliumperchlorat absorbiert.
- iv) mit 98 - 100 %iger Ameisensäure zwei Stunden lang bei 175 °C. Diese Methode hat sich als sehr gut bei der quantitativen Hydrolyse der DNS bewährt. Die Hydrolyse erfolgt in abgeschmolzenen Glasampullen.

1. Die Salmon-Spermien-DNS-Hydrolyse

Zur Hydrolyse der Salmon-Spermien-DNS wurde Ameisensäure ausgewählt. Zuerst wurden je 0,2 ml Ameisensäure den Rückständen der verdampften DNS-Lösung (vgl. A 1) zugesetzt. Da diese Ameisensäurekonzentration für eine vollständige Ausbeute von Adenin und Guanin nicht ausreichte, wurde sie auf 1 ml, d.h. auf 500 μ l pro mg DNS erhöht. Die vier Glasampullen wurden dann am Hals abgeschmolzen, vorsichtig in eine Metallbombe gebracht, die wiederum fest verschlossen wurde. Dieses Verfahren diente dazu, überschüssige oxydierende Luft während der Erhitzung zu vermeiden. Die gefüllte Bombe wurde bei 175 °C zwei Stunden lang in den Trockenschrank gelegt. Der nächste Schritt in der Hydrolyse war die Entfernung der überschüssigen Ameisensäure und ihrer Zersetzungsprodukte: Kohlenmonoxyd und Wasserdampf.



Diese Zersetzungsprodukte erzeugten in der verschlossenen Glasampulle einen beachtlichen Druck. Um diesen zu verringern, wurde die Ampulle in einen Kälte-Thermostaten (Colora-Messtechnik) gesteckt bei - 40 °C. Alle Komponenten in der Ampulle bis auf das Kohlenmonoxyd waren gefroren und somit der Druck durch den entfallenden Wasserdampfdruck vermindert. Zur Austreibung der Kohlenmonoxydes wurde die Spitze der verschlossenen Ampulle in einer Bunsenflamme vorsichtig abgeschmolzen. Nachdem das Gas entwichen war, wurde das Hydrolysat, d.h. der verbliebene Inhalt der Ampulle, in einem mit KOH versehenen Vakuum-Exsikkator verdampft.

2. Die RNS-Core-Hydrolyse

Die Abspaltung der RNS-Core wurde mit 70 %iger Perchlorsäure durchgeführt. Die vier Trockenrückstände der RNS-Core-Lösungen (Vgl. A 2) wurden mit 0,03 ml Perchlorsäure vermischt. Die vier Ampullen, die die Gemische enthielten, wurden sodann im Wasserbad eine Stunde lang bei 90 °C erhitzt. Jedes Gemisch wurde mit bi-distilliertem Wasser auf 0,2 ml aufgefüllt.

D. Die Papierchromatographische Auftrennung der Basen

Die Papierchromatographie wurde zum ersten Mal im Jahre 1944 von RAPHAEL COUSDEN, A.H. GORDON und A.J.P. MARTIN beschrieben. Sie verwendeten damals zur Trennung von Aminosäuren eine mit Silikagel gefüllte Glassäule und identifizierten die Fraktionen papierchromatographisch.

Die Trennung der Nukleinsäurekomponenten durch Chromatographie auf Filterpapier wurde in den Jahren 1947 und 1948 erstmals von VISCHER, CHARGRAFF und auch von HOTCHKISS durchgeführt. Die ursprüngliche Papierchromatographie erfolgte nach dem "absteigendem" Verfahren. Hierbei läuft das Lösungsmittel mit einer Geschwindigkeit von ca. 2,5 cm/Stunde von oben nach unten. Die "absteigende" Technik kann für Streifen bis zu 120 cm Länge angewandt werden. Man kennt außerdem elliptische und die zirkuläre Methoden.

Die "aufsteigende" Technik ist ein viel schnelleres Verfahren (STRONG): Sie wird weitgehend zur Analyse von Substanzen angewandt, die sich auf 25 bis 30 cm langen Papierstreifen leicht trennen.

Ein wichtiger Faktor für die Wahl einer geeigneten Technik ist der R_F -Wert der Nukleinsäurenkomponenten.

Der R_F -Wert wird als "Ratio of Fronts" definiert:

$$R_F = \frac{\text{Entfernung Start - Substanzfleck}}{\text{Entfernung Start - Lösungsmittelfront}}$$

Die R_f -Werte werden durch folgende Komponenten beeinflusst (STRONG):

- i) durch die Art des Chromatographiepapiers,
- ii) durch die Orientierung der Papierfasern,
- iii) durch die Länge des Papierstreifens,
- iv) durch die Zusammensetzung des Lösungsmittels,
- v) durch den Anfangsabstand des Lösungsmittels vom Startpunkt,
- vi) durch die Konzentration der zu analysierenden Substanz,
- vii) durch die Verunreinigungen, die im Lösungsmittel und in der gelösten Substanz,
- viii) durch die Versuchstemperatur, die den Verteilungskoeffizienten beeinflusst,
- ix) durch die Art der verwendeten Technik.

1. Salmon-Spermien-DNS-Auftrennung

Die absteigende Technik wurde für die quantitative Ermittlung des Hydrolysats (vgl. C 1, d.h. für die nach Hydrolyse entstandenen Purin- und Pyrimidin-Komponenten der Salmon-Spermien-DNS) bevorzugt. Es war nötig, säuregewaschenes Chromatogramm zu verwenden. Da ein chromatographisches Filterpapier eine gewisse Menge UV-absorbierendes Material enthält, die sich durch ein chromatographisches Lösungsmittel eluieren laeset, besonders wenn das Lösungsmittel Säure ist; und die sich im Streifen an oder hinter der Lösungsmittelfront niederschlagen. Als Lösungsmittelsystem wurde ein Gemisch von Isopropanol, konz. HCL und Wasser im Verhältnis von 195 ml : 50 ml : 55 ml verwendet. Das Gesamtvolumen des Gemisches betrug daher 300 ml. Dieses Lösungsmittelsystem hat den besonderen Vorteil, den sonst niedrigeren R_f -Wert des Guanins zu erhöhen; es ist auch imstande, bis zu 75 μ g pro Fleck jedes DNS-Base bei 35 cm Entfernung der Lösungsmittelfront aufzulösen. Uracil wird gleichfalls resolviert.

Das Hydrolysat (vgl. C 1) wurde wieder mit 0,2 ml 2 N HCl gelöst. 0,06 ml der Lösung wurde auspipettiert und sodann langsam und vorsichtig auf das chromatographische Papier aufgetragen, dadurch bildete sich an der Startlinie des Papiers ein 2 cm langes Band. Dieses Verfahren wurde für die drei übrigen Hydrolysate wiederholt. Infolgedessen ergaben sich vier Bande auf dem Chromatogramm, das 50 cm lang und 25 cm breit war. Der Abstand zwischen zwei benachbarten Banden betrug 4 cm.

Das Chromatogramm wurde übernacht in eine geschlossene Kammer gehängt, deren Atmosphäre mit allen Komponenten des verwendeten Lösungsmittelsystems (Isopropanol, Konz. HCl, H_2O) gesättigt war. Nach dem Durchlaufen wurde das chromatographische Papier getrocknet und die aufgetrennten Flecke entsprechend den Guanin-, Adenin-, Cytosin- und Thyminbasen der Salmon-Spermien-DNS mit einer Hg-Niederdrucklampe untersucht. Dieser Vorgang basiert auf der Tatsache, daß wenn man ein Papierchromatogramm unter eine UV-Lampe mit einer hohen Emission im Bereich der maximalen Nukleinsäure-Absorption (260 nm) und mit dem entsprechenden Filter für sichtbares Licht untersucht, die Flecken von Nukleinsäurekomponenten als dunkle Bezirke gegen die Hintergrundfluoreszenz des Filterpapiers erscheinen. Auf diese Weise ist es möglich, beispielsweise 0,2 μ g Adenin, das sich über einen Bereich von 1,5 cm Durchmesser verteilt hat, zu ermitteln.

Die R_f -Werte, die bei den Versuchen erhalten wurden, waren in enger Übereinstimmung mit den Standardwerten, die in Tabelle 1 wiedergegeben sind.

Tabelle 1

Standard-R_F-Werte

Lösungsmittelsystem	Isopropanol, Konz. HCl, H ₂ O			
DNS-Quelle	Salmon-Spermien			
DNS-Basen	Guanin	Adenin	Cytosin	Thymin
R _F -Werte	0,25	0,36	0,47	0,77

2. Die RNS-Core-Auftrennung

Es war nicht nötig, das RNS-Core-Hydrolysat (vgl. C 2) vor der papierchromatischen Auftrennung mit alkalischer Lösung zu neutralisieren. Die Auftrennung wurde wie bei D 1 durchgeführt. Anstelle von Thymin kam jedoch hier Uracil vor.

E. Die Elution und die Spektrometrie

Zur quantitativen Ermittlung der Nukleinsäuren und ihrer Komponenten werden die Flecken auf dem Papierchromatogramm ausgeschnitten und eluiert. Die Volumina werden so ausgewählt, daß die Extinktion mit Küvetten abgelesen werden kann. In 0,1 N HCl sind Nukleinsäuren ausreichend löslich. Allerdings haben einige von ihnen in diesen Eluenten höhere Extinktionskoeffizienten als in neutralen und alkalischen

Lösungen. Ein Stehenlassen übernacht bei Zimmertemperatur und ein Schütteln vorher und nachher beeinflußt die quantitative Eluierung.

Um Fehler zu vermeiden, die auf UV-absorbierenden Substanzen beruhen, werden Blindprobenflecken, die gleich groß wie die eigentlichen Substanzflecken sind, ausgeschnitten und nach derselben Methode eluiert und ausgemessen.

Um Fehler, die auf UV-absorbierenden Schmutzstoffen beruhen, auszuschließen, werden die Extinktionen aller Eluate nicht nur bei dem Absorptionsmaximum der betreffenden Substanz, sondern auch bei anderen Wellenlängen abgelesen, die der Absorption der Substanz bei kürzeren Wellenlängen entsprechen.

Wie alle anderen organischen Verbindungen absorbieren die Nukleinsäuren und ihre Komponenten im ultravioletten Gebiet, das man aus experimentellen Gründen in das nahe UV (400 - 200 nm) und in das ferne oder Vakuum ($\lambda < 200$ nm) teilt. Bei einer gegebenen UV-Wellenlänge ist die Extinktion der Konzentration des Eluates proportional, unter der Voraussetzung, daß das LAMBERT-BEERSCHE-Gesetz Gültigkeit hat.

$$E = \lg \frac{J_0}{J} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Die Extinktion (optische Dichte) E ist der Konzentration (C), der Schichtdicke der durchstrahlten Substanz (d) und einer Konstanten (ϵ) proportional. ϵ wird als molarer Extinktionskoeffizient bezeichnet, der für jede Substanz charakteristisch ist.

1. Die Salmon-Spermien-DNS

Guanin-, Adenin-, Cytosin- und Thyminflecken (jeder 4 cm² im Querschnitt) und vier gleichgroße Blindprobeflecken werden vom Papierchromatogramm ausgeschnitten (vgl. C 1); somit werden für 3 Hydrolysate 16 Ausschnitte hergestellt. Jeder Schnitt wurde vier Mal gefaltet und dann in ein Reagenglas eingebracht, wo er mit 5 ml 0,1 N HCl eluiert wurde. Das Eluat (5 ml) wurde in eine Küvette eingegossen und die entsprechenden Extinktionswerte mit Hilfe eines lichtelektrischen Spektralphotometers (CARL ZEISS) bei folgenden Wellenlängen ermittelt:

Guanin	-	248,	250,	260,	280	nm
Adenin	-	250,	260,	263,	280	nm
Cytosin	-	250,	260,	274,	280	nm
Thymin	-	250,	260,	264,	280	nm

2. Die RNS-Core

Unter Verwendung von RNS-Core, waren die Eluate genauso wie die des Guanins, Adenins, Cytosins und Uracils. Die Extinktionswerte für das Uracil-Eluat wurden bei den Wellenlängen 250, 259, 260 und 280 nm bestimmt.

F. Die Kohlenwasserstoffe

Die zur biologischen Untersuchung meist gebrauchten polyzyklischen Kohlenwasserstoffe sind 3,4-Benzpyren, 1,2,5,6-Dibenzanthracen, 3- oder 20-Methylcholanthren und 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen; alle sind als Handelspräparate vorhanden. 3-Methylcholanthren und 3,4-Benzpyren sind in Azeton löslich. 1,2,5,6-Dibenzanthracen ist schwer löslich. Es ist üblich, eine 0,3 - 1 %ige Lösung dieses Kohlenwasserstoffes zum Gebrauch einzustellen.

Es wurde je eine 0,26 %ige Lösung von 3,4-Benzpyren, von 1,2,5,6-Dibenzanthracen und von 3-Methylcholanthren eingestellt, d.h. 28 mg des entsprechenden Kohlenwasserstoffes wurden in 10 ml Azeton gelöst.

1. Die Salmon-Spermien-DNS

0,2 ml der 0,26 %igen Lösungen der drei cancerogenen Kohlenwasserstoffe wurden in die 1 ml 0,2 %ige Salmon-Spermien-DNS-Lösung enthaltende Glasampulle (vgl. A 1) einpipettiert. Das Gemisch wurde gründlich geschüttelt und das Lösungsmittel Azeton mit Äther entfernt.

2. Die RNS-Core

1 ml 0,2 %ige RNS-Core-Lösung wurde in gleicher Weise behandelt (F 1).

G. Die Bestrahlung und die Erwärmung

Mit sichtbarem Licht läßt sich die photochemische Wirkung der cancerogenen Kohlenwasserstoffe auf DNS nachweisen. Mäßige Erwärmung verstärkt diesen Effekt (CRILE). Als Strahlenquelle wurde eine Tageslichtlampe (Quecksilberdampf Lampe HPR 125 W) der Firma PHILIPPS verwendet.

Absolute Energieverteilung

Wellenlänge	313	365	391-408	436	546	578	m
Absolute Energie	0,1	2,1	1	1,6	2,2	2,0	W

Zwei solche Tageslichtlampen wurden in 10 cm Abstand einander gegenübergestellt. Die berechnete Strahlungsenergie betrug: $7 \cdot 10^3 \text{ erg/sec/mm}^2$. Der Bestrahlungseffekt wurde durch den Ultrathermostaten (COLORA) thermisch verstärkt.

Die vier Ampullen (vgl. F 1 und F 2) wurden in einem Wasserbad von 10 cm Durchmesser, dem Abstand der zwei Tageslichtlampen entsprechend, eingestellt. Die Temperatur wurde bis 40°C konstant gehalten.

Die Bestrahlungsdauern betrugen 1, 2, 4 und 6 Stunden.

H. Addendum

Es wurde entschieden, die Wirkungen der cancerogenen Kohlenwasserstoffe und der Bestrahlung in den folgenden Versuchen bei geeigneten Nukleinsäurekomponenten zu untersuchen.

Die ausgewählten Komponenten waren Guanin- und Adenin-Desoxyribosid bei der DNS und Guanosin und Adenosin bei der RNS. In Bezug auf 0,2 % RNS-Core- und Salmon-Spermien-DNS-Lösung wurden die äquivalenten Konzentrationen beider Nukleosidarten aus den Molarverhältnissen der RNS-Core- und der DNS-Basen berechnet. Die Molarverhältnisse der Salmon-Spermien-DNS ergaben folgende Werte:

Guanin	-	22,4 %
Adenin	-	28,8 %
Cytosin	-	21,6 %
Thymin	-	27,2 %

Die entsprechenden Werte der RNS-Core waren:

Guanin	-	44,0 %
Adenin	-	33,7 %
Cytosin	-	9,7 %
Uracil	-	8,1 %
Thymin	-	4,5 %

Die vorstehenden Werte stimmen mit denjenigen gut überein, die von Herrn DR. DELLWEG berechnet wurden. Folglich ergab sich die richtige Konzentration des Guanin- und Adenin-Desoxyribosid-Gemisches als 0,103 % und die des Guanosin- und Adenosin-Gemisches als 0,158 %, in Bezug auf 0,2 % RNS-Core und Salmon-Spermien-DNS.

1 ml des 0,103 %igen Desoxyguanosin - Desoxyadenosin-Gemisches wurde direkt, d.h. ohne Hydrolyse mit 0,2 ml des entsprechenden carcinogenen Kohlenwasserstoffes (vgl. F) versetzt; das Gemisch wurde sodann - wie oben schon beschrieben - bei 40 °C bestrahlt. Die Bestrahlungsdauer betrug 4 und 6 Stunden.

1 ml des 0,158 %igen Guanosin-Adenosin-Gemisches wurde in ähnlicher Weise behandelt.

IV. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Versuche, die Wirkungen von cancerogenen Kohlenwasserstoffen und von Bestrahlung auf Nukleinsäuren zu untersuchen, lassen sich in zwei Gruppen teilen. Es handelt sich bei der einen Gruppe (A) um die Wirkungen der Kohlenwasserstoffe und der Bestrahlung bei Zimmertemperatur, und bei der anderen Gruppe (B) um die Wirkungen bei 40 °C. Offenbar wurde bei der zweiten Gruppe die zerstörende Wirkung der cancerogenen Kohlenwasserstoffe und der Bestrahlung durch Wärme verstärkt.

1. Die Gruppe A

Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Tabelle 2

Extinktionswerte der behandelten

Salmon-Spermien-DNS-Basen

Salmon-Spermien-DNS-Basen	Ohne Bestrahlung		nach zwei Stunden Bestrahlung		nach zwei Stunden Bestrahlung + 0,26 % 3-Meth. cholanthren	
	E _{max.}	E _{min.}	E _{max.}	E _{min.}	E _{max.}	E _{min.}
Guanin	830	495	750	445	580	345
Adenin	1.250	470	1.130	417	1.000	375
Cytosin	740	214	660	188	595	165
Thymin	730	378	630	325	630	288

2. Die Gruppe B

Die Ergebnisse dieser Gruppe wurden durch Einwirkung der drei cancerogenen Kohlenwasserstoffe, nämlich 3,4-Benzpyren, 1,2,5,6-Dibenzanthracen und 3-Methylcholanthren, und der Bestrahlung bei 40 °C erhalten.

Tabelle 3a

Die Extinktionswerte der Salmon-Spermien-DNS-Basen nach Einwirkung von cancerogenen Kohlenwasserstoffen bei verschiedener Bestrahlungsdauer

Canc. Kohlenwasserstoffe (10^{-2} M) bzw. Kontrolle	Extinktionswerte der Salmon-Spermien-DNS-Basen ($\times 10^{-3}$)				Bestrahlungsdauer Stunden
	Guanin	Adenin	Cytosin	Thymin	
1,2,5,6-Dibenzanthracen	670	1.330	802	820	2
3-Methylcholanthren	+	+	+	+	
3,4-Benzpyren	790	510	780	860	
Kontrolle	830	790	785	815	
1,2,5,6-Dibenzanthracen	180	1.210	725	665	4
3-Methylcholanthren	220	1.180	715	700	
3,4-Benzpyren	630	440	690	820	
Kontrolle	635	780	685	590	
1,2,5,6-Dibenzanthracen	24	860	540	640	6
3-Methylcholanthren	25	1.000	520	690	
3,4-Benzpyren	560	435	740	820	
Kontrolle	600	860	390	660	

+) = nicht bestimmt

Kontrolle : DNS bestrahlt

Tabelle 3b

Die Extinktionswerte der RNS-Core-Basen nach Einwirkung von
cancerogenen Kohlenwasserstoffen bei verschiedener
Bestrahlungsdauer

Canc. Kohlenwasser- stoffe (10^{-2} M) bzw. Kontrolle	Extinktionswerte der RNS-Core-Basen ($\times 10^{-3}$)				Bestrah- lungs- dauer Stunden
	Guanin	Adenin	Cytosin	Uracil	
1,2,5,6-Dibenzanthracen	800	700	265	160	4
3-Methylcholanthren	900	740	265	153	
3,4-Benzpyren	680	670	240	135	
Kontrolle	1.320	840	390	147	
1,2,5,6-Dibenzanthracen	610	730	342	257	6
3-Methylcholanthren	570	635	292	310	
3,4-Benzpyren	450	465	185	192	
Kontrolle	1.230	840	365	280	

Tabelle 4a

Die prozentuale Zerstörung der Salmon-Spermien-DNS-Basen

Can. Kohlenwasserstoffe (10 ⁻⁴ M)	Zerstörung der Salmon-Spermien - DNS-Basen (%)				Bestrah- lungs- dauer Stunden
	Guanin	Adenin	Cytosin	Thymin	
1,2,5,6-Dibenzanthracen	20	-	-	-	2
3-Methylcholanthren	+))	-	-	-	
3,4-Benzpyren	5	35	-	-	
1,2,5,6-Dibenzanthracen	72	-	-	-	4
3-Methylcholanthren	65	-	-	-	
3,4-Benzpyren	-	43	-	-	
1,2,5,6-Dibenzanthracen	96	-	-	3	6
3-Methylcholanthren	96	-	-	-	
3,4-Benzpyren	7	49	-	-	

+) = nicht bestimmt

Tabelle 4b

Die prozentuale Zerstörung der HNS-Core-Basen

Canc. Kohlenwasser- stoffe	Zerstörung der HNS-Core-Basen (%)				Bestrah- lungs- dauer
	Guanin	Adenin	Cytosin	Uracil	
1,2,5,8-Dibenzanthracen	40	17	32	-	4 Std.
3-Methylcholanthren	36	12	30	-	
3,4-Benzpyren	40	20	38	8	
1,2,5,6-Dibenzanthracen	50	13	7	2	6 Std.
3-Methylcholanthren	53	24	20	-	
3,4-Benzpyren	65	44	49	31	

Tabelle 5

Die Extinktionswerte der Basen der Adenin-Guaninnukleoside von
der DNS und der RNS

Canc. Kohlenwasserstoffe (10^{-2}) bzw. + Kontrolle	Extinktionswert des Desoxyguanin- Desoxyadenin-Ge- misches ($\times 10^{-3}$)		Extinktionswert des Guanosin-Aden- nosin-Gemisches ($\times 10^{-3}$)		Bestrah- lungs- dauer Stunden
	Guanin	Adenin	Guanin	Adenin	
1,2,3,4-Dibenzanthracen	4	1.150	96	1.700	4
1-Methylcholanthren	10	1.660	64	1.650	
1,4-Benzpyren	740	1.710	670	1.400	
Kontrolle	835	1.450	1.400	1.900	
1,2,5,8-Dibenzanthracen	34	1.100	1.300	1.780	6
3-Methylcholanthren	82	1.250	1.060	1.520	
7,8-Benzpyren	255	1.355	880	2.000	
Kontrolle	980	1.560	1.620	1.910	

Tabelle 6

Die prozentuale Zerstörung der Adenin-Guanin-Nukleoside von
der DNS und von der RNS

Canc. Kohlenwasserstoffe (10 ⁻² M)	Desoxyguanosin- Desoxyadenin-Ge- mischtes (%)		Extinktionswerte des Guanosin-Aden- nosin-Gemisches		Bestrah- lungs- dauer Stunden
	Guanin	Adenin	Guanin	Adenin	
1,2,5,6-Dibenzanthracen	95	21	93	10	4
3-Methylcholanthren	88	-	95	13	
3,4-Benzpyren	11	-	52	22	
1,2,5,6-Dibenzanthracen	96	29	19	6	6
3-Methylcholanthren	91	19	34	31	
3,4-Benzpyren	74	13	45	-	

V. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Es ist nötig, die photochemische Aktivität der drei cancerogenen Kohlenwasserstoffe (1,2,5,6-Dibenzanthracen, 3-Methylcholanthren und 3,4-Benzpyren) durch die Extinktionswerte der zerstörten Purin- und Pyrimidinbasen auszudrücken. Brachte man Salmon-Spermien-DNS mit 3-Methylcholanthren zusammen und bestrahlte das Gemisch, so beobachtete man keine nennenswerte Veränderung in der DNS. Dennoch waren die Ergebnisse anders, wenn die Bestrahlung durch die Wärme des Wasserbades von 40 °C ergänzt wurde.

Es wurde gefunden, daß eine Erwärmung auf 40 °C bei 1,2,5,6-Dibenzanthracen, 3-Methylcholanthren und 3,4-Benzpyren Veränderungen in der DNS bewirkten. Diese Veränderungen sind durch die Extinktionswerte der Purin- und Pyrimidinkomponenten der DNS in den Tabellen 3a und 3b sowie 4a bewiesen.

Keiner der drei cancerogenen Kohlenwasserstoffe reagierte mit den Pyrimidinbasen (Cytosin und Thymin) der Salmon-Spermien-DNS; die Purinbasen (Guanin und Adenin) wurden dagegen zerstört. Die zerstörende Wirkung der Kohlenwasserstoffe auf Guanin und Adenin nahm mit verlängerter Bestrahlungsdauer zu. Die Verlängerung der Bestrahlungsdauer hatte auf die Cytosin- und Thyminkomponenten keine Wirkung.

Wie schon in Tabelle 4a aufgezeigt, wurden vorzugsweise Guanin und Adenin angegriffen. Während 1,2,5,6-Dibenzanthracen und 3-Methylcholanthren mit Guanin und nicht Adenin reagierten, bevorzugte 3,4-Benzpyren Adenin. 3,4-Benzpyren zerstörte nach 2 und 4 Stunden Bestrahlung das Guanin nicht. Nach 6-stündiger

Bestrahlung war die Menge Guanin, die durch 3,4-Benzpyren zerstört wurde, beträchtlich gering (7 %) im Vergleich zu 99,9 % durch 1,2,5,6-Dibenzanthracen und 3-Methylcholanthren. Nach einer Bestrahlungsdauer von 6 Stunden betrug die zerstörte Adeninmenge 43 %. Die Wirkung des 1,2,5,6-Dibenzanthracens auf Guanin war stärker als die des 3-Methylcholanthrens.

Im Vergleich zu der Salmon-Spermien-DNS war die RNS-Core den Wirkungen der drei cancerogenen Kohlenwasserstoffe (vgl. Tabellen 3b und 4b) viel zugänglicher. Die Purin- und die Pyrimidinbasen der RNS-Core wurden durch alle drei Kohlenwasserstoffe angegriffen. Dies steht im Gegensatz zur DNS, in der nur die Purinbasen angegriffen wurden. Die vier Basenkomponenten Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil wurden durch 3,4-Benzpyren und 1,2,5,6-Dibenzanthracen zerstört. 3-Methylcholanthren wirkte auf alle Basen, außer auf Uracil ein. Wie bei der DNS, nahm die Anzahl der zerstörten Basen zu, wenn die Bestrahlungsdauer verlängert wurde. Beispielsweise griff 1,2,5,6-Dibenzanthracen Uracil nach 4 Stunden noch nicht an, aber nach 6 Stunden stellte sich heraus, daß 8 % des ursprünglichen Uracils in der RNS-Core zerstört wurden. Es hatte also tatsächlich eine Reaktion stattgefunden. Aus der Tabelle 4b ersieht man, daß die Aktivität des 3-Methylcholanthrens mit RNS-Core-Basen stärker ist als die des 1,2,5,6-Dibenzanthracens.

Die Aktivität des 3,4-Benzpyrens mit Guanin, Cytosin und Uracil in der RNS-Core ist am regelmäßigsten wie Tabelle 4b zeigt. Hier liegt eine eindeutige Abhängigkeit von der Aktivität und von der Bestrahlungsdauer vor. Diese Feststellung ist nicht verwunderlich und wird durch die Befunde von RICE (1964) unterstützt, der experimentell nachgewiesen hat, daß Benzpyren stabile Anlagerungsverbindungen

(Addukte) mit Uracil, Cytosin, Guanin unter UV-Bestrahlung bildet. Nach ihm ist Benzpyren und nicht die Basen das Primärchromophor. Fig. 14 zeigt ein typisches Beispiel dieser stabilen Anlagerungsverbindung, auch Photoprodukt genannt.

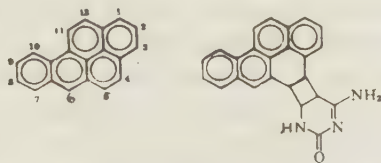


Fig. 14 : Benzpyren-Cytosin-Addukt

Man merkt in diesem Beispiel, daß die Additionsreaktion des Benzpyrens mit Cytosin an der "K"-Region des Benzpyrens stattfindet. Das stimmt mit der PULLMANN-DAUDEL-THEORIE überein.

Wie aus den Tabellen 5 und 6 entnommen werden kann, waren die zerstörenden Wirkungen des 1,2,5,6-Dibenzanthracens, des 3-Methylcholanthrens und des 3,4-Benzpyrens auf die Basen (Adenin und Guanin) der entsprechenden DNS- und RNS-Nukleoside nicht gleichmäßig und deshalb nicht gut erklärlich. Dennoch ist es interessant, daß im Falle der RNS-Core, das Guanin im Desoxyguanosin-Desoxyadenosin-Gemisch und Guanosin-Adenosin-Gemisch durch alle drei cancerogenen Kohlenwasserstoffe zerstört wurde. Jedoch nahm die Zerstörung bei Verlängerung der Bestrahlungsdauer nicht zu. Sie nahm vielmehr ab, wenn Benzpyren verwendet wurde. Es wurde überraschenderweise gefunden, daß das Adenin im Desoxyguanosin-Desoxyadenosin-Gemisch und im Guanosin-Adenin-Gemisch durch 3,4-Benzpyren am wenigsten angegriffen wurde.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde in den vorstehenden Versuchen bewiesen, daß die cancerogenen Kohlenwasserstoffe, 1,2,5,6-Dibenzanthracen, 3-Methylcholanthren und 3,4-Benzpyren unter Bestrahlung mit einer Tageslichtlampe (-7×10^3 erg/mm²/sec), zerstörende Wirkungen in der Salmon-Spermien-DNS-Struktur verursacht haben. Jedoch traten diese Veränderungen erst dann auf, wenn die Bestrahlung durch die Wärme des Wasserbades von 40 °C ergänzt wurde. Offenbar lag diese Temperatur unterhalb der kritischen oder thermalen Denaturierungstemperatur von Nukleinsäuren, so daß die Doppelhelix der DNS bzw. RNS-Core als nicht in "Single-Strands" gespalten angesehen werden kann. Wahrscheinlich bestand die Wirkung der Wärme darin, die Starrheit der Salmon-Spermien-DNS bzw. der RNS-Core-Doppelhelix zu schwächen, damit die Basenpaare frei waren, um mit den cancerogenen Kohlenwasserstoffen zu reagieren.

Es wurde gefunden, daß die zerstörenden Effekte der drei cancerogenen Kohlenwasserstoffe auf RNS-Core umfassender waren als auf Salmon-Spermien-DNS. Alle vier Basen, Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil waren der photochemischen Einwirkung der Kohlenwasserstoffe zugänglich. Die leichte Löslichkeit der RNS-Core in bi-distilliertem Wasser mag diese Tatsache erklären. Wie oben erwähnt, waren nur 1,2,5,6-Dibenzanthracen und 3-Methylcholanthren imstande, die Guaninbase der DNS zu zerstören. Die übrigen Basen, Adenin, Cytosin und Thymin wurden nicht angegriffen. Andererseits bevorzugte 3,4-Benzpyren Adenin. Das Cytosin und das Thymin der DNS wurden ebenfalls nicht zerstört. Die Abhängigkeit der photochemischen Aktivität der cancerogenen Kohlenwasserstoffe mit Nukleinsäuren von der Bestrahlungsdauer wurde am deutlichsten durch die Ergebnisse mit 3,4-Benzpyren demonstriert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- BOYLAND & GREEN Brit. J. Cancer, 16, 347 (1962)
- CHARGAFF, E. & DAVIDSON, J.N. The Nucleic Acids, Vol. 1 (1955)
- CLAR Polycyclic Hydrocarbons Vol. I & II
Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg
(1963)
- COCK, J. W. & HASLEWOOD, G. Chem. and Ind. 38, 758 (1933)
- CRILE, G. Jr. J. Cancer Research, Vol. 23, No. 3, 372
Mar. (1963)
- DAVENPORT, G.R. *
HEIDELBERGER, C. Acta Unio Int. C. Canc. 17,55 (1961)
- DAVISON Vortrag im Institut für therapeutische
Biochemie zu Frankfurt am Main (Mai 1964).
- HEIDELBERGER, C.,
GIOVANELLA, B.C. *
MC.KINNEY, L.E. J. Mol. Biology, 20-27 (1964)
- HADDOW, A. et al .Advanc. in Cancer Re. (1953/1958)
- HIEGER, J. & KENNAWAY, E. Proc. royal Soc. London, 117, 318 (1935).
- HOWELL-CLARK, J. T. J. Cancer Res. Vol. 24, No. 2, 207
Feb. (1964)

- JACOBSON, E. et al Natur. 173, 772 (1954)
- KENNAWAY, E. et al Amer. J. Cancer 33, 50 (1938)
- LERMANN, L.S. J. Mol. Biol. 3, 18 (1961)
- LIQUORI, A.M. et al J. Mol. Biol. 5, 521 (1962)
- MICHELSON, A.M. The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides (1963)
- POTT, Percival Surgical Observations relative to ----- the cancer of the Serotum (London 1775)
- PULLMANN, A. & PULLMANN, B. Adv. Cancer Research, 3, 117 (1955)
- RICE, J.M. J. Chem. Soc. Vol. 86, 1444, April (1964)
- SCHOENTHAL, R. Nature, London 188, 420 (1960).
- STRONG, C.L. Scientific Amer. Magazine, 162 July (1961)
- SINSHEIMER & HOPKINS Biochim. Biophys. Acta. 18 13-27 (1960).
- VIRCHOW, R. Die krankhaften Geschwülste Berlin (1863)
- WACKER, A.,
DELLWEG, H. &
WEINBLUM, D. Naturwissenschaften, 47, 477 (1960)
- WEINBLUM, D. Dissertation, Technische Universität Berlin (1961)
- ZAMAGIVA, K. & ITSCHIKAWA, K. J. Cancer Res. 3, 1 (1918)

Zum Schluß dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. A. Wacker für die Überlassung des Themas sowie für die vielen Anregungen und Hilfe bedanken, die er mir bei Bearbeitung desselben gab.

Außerdem gilt mein Dank allen, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit geholfen haben, vor allen Dingen Herrn Dr. Weinblum, der mir bei der praktischen Arbeit immer zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich auch an dieser Stelle Frau Dr. Thiel danken, die mir bei der Niederschrift meiner Arbeit sehr geholfen hat.

LEBENSLAUF

Ich, Peter Koyi Idundun, wurde am 26. 7. 1936 als Sohn des Regierungsbeamten Peter Ulionerajolo Idundun und seiner Ehefrau Osangbuwa, geborene Kpenosen in Koko (Nigeria) geboren. Allerdings bin ich in Lagos zu Hause, dem Sitz meiner Eltern. Nach der Volksschulbildung besuchte ich 1949 die Oberschule King's College Lagos, wo ich 1953 das London General Certificate of Education bestand. 1955 besuchte ich South-West Technical College, London, und bestand dort im Jahre 1957 das Inter-B.Sc., Oxford University; und von 1958 - 1959 besuchte ich Birmingham University wo ich naturwissenschaftliche sowie medizinische Vorlesungen belegte.

Im Sommer 1960 immatrikulierte ich an der Universität Heidelberg wo ich im Februar 1961 das Physikum ablegte. Im Sommer 1963 zog ich nach Frankfurt (Main) und im Wintersemester desselben Jahres setzte ich mein medizinisches Studium an der Universität Frankfurt (Main) fort. Hier beendete ich das Studium mit der ärztlichen Prüfung der Universität Heidelberg, die ich im März 1965 bestand.

Meine akademischen Lehrer waren :

Prof. Dr. W. Artelt	Geschichte der Medizin
Prof. Dr. K. Bauer	Chirurgie
Prof. Dr. O. Eichler	Pharmakologie
Prof. Dr. J. Frey	Innere Medizin
Prof. Dr. J. Gerchow	Gerichtsmedizin
Prof. Dr. F. Herrmann	Hautklinik
Prof. Dr. K. Herzberg	Hygiene
Prof. Dr. H. Hoepke	Anatomie
Prof. Dr. W. Kindler	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Prof. Dr. W. Kutscher	Physiologische Chemie
Prof. Dr. K. Lindemann	Orthopädie
Prof. Dr. Mathes	Innere Medizin
Prof. Dr. W. Rotter	Pathologie
Prof. Dr. H. Schaefer	Physiologie
Prof. Dr. R. Thiel	Augenklinik
Prof. Dr. K. Weiße	Kinderklinik
Prof. Dr. J. Zutt	Nervenklinik

VERPFLICHTUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Untersuchungen über die photochemische Wirkung von cancerogenen Kohlenwasserstoffen auf die Desoxyribonukleinsäure und auf die Ribonukleinsäure"

in dem Institut für therapeutische Biochemie, Frankfurt am Main, unter der Leitung und mit der Unterstützung von Prof. A. Wacker ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benützt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 17. Mai 1965

Peter M. J. J. J.

